

10/517501

REC'D 05 SEP 2003

WIPO PCT

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

BEST AVAILABLE COPY

**Aktenzeichen:** 102 25 501.6

**Anmeldetag:** 10. Juni 2002

**Anmelder/Inhaber:** Eppendorf AG, Hamburg/DE

**Bezeichnung:** Verfahren zur Immobilisierung von in einer flüssigen Probe enthaltenen Proteinen mit anschließender Trocknung der immobilisierten Proteine, sowie in dem Verfahren einsetzbare Festphasensubstrate

**IPC:** C 07 K 17/10

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 13. Juni 2003  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Dzierzga

# Patentanwälte Schaefer & Emmel

European Patent Attorneys

Dipl. - Phys. Konrad Schaefer

Dipl. - Biol. Dr. Thomas Emmel

Tel: (0)-40-6562051 Fax: -6567919

Gehölzweg 20, D-22043 Hamburg

Commerzbank 22 / 58226 Blz 200 40 000

Postbank 225058 - 208 Blz 200 10 020

05. Juni 2002

Uns. Zeichen: 03329

Eppendorf AG

---

Verfahren zur Immobilisierung von in einer flüssigen Probe enthaltenen Proteinen mit anschließender Trocknung der immobilisierten Proteine, sowie in dem Verfahren einsetzbare Festphasensubstrate.

---

Die Erfindung bezieht sich auf Verfahren nach dem Oberbegriff der Ansprüche 1 und 3 sowie auf ein zur Immobilisierung von Proteinen geeignetes Festphasensubstrat nach Anspruch 4.

Die Immobilisierung und Trocknung von Proteinen an Festphasenoberflächen (im folgenden Substrat genannt) ist z.B. erforderlich bei der Herstellung von Protein-Arrays, Enzymmembranen, mit Proteinen beschichteten Reaktionsgefäßen etc.

Gattungsgemäße Verfahren umfassen im wesentlichen folgende Schritte:

1. Eine proteinhaltige Lösung wird in Kontakt gebracht mit einem aktivierten Substrat. Bei dem Substrat kann es sich wie oben erwähnt z.B. um ein Filter, eine Membran, ein Chip, ein Reaktionsgefäß handeln, um nur einige übliche Einrichtungen aufzuzählen.

Übliche Substrate weisen reaktive, insbesondere esteraktive Bindungsstellen auf, die mit einer OH-Gruppe eine kovalente Bindung eingehen können. Bei Kontakt mit dem Substrat werden die Proteine kovalent an die reaktiven Bindungsstellen gebunden und auf diese Weise an dem Substrat immobilisiert.

2. Das Substrat wird dann ggf. gewaschen.
3. In einem nächsten Schritt werden die Bindungsstellen auf dem Substrat durch z.B. Zugabe eines starken nucleophilen Agens, z.B. eines kurzkettigen Amins, blockiert.
4. Es wird dann erneut gewaschen, wobei dieser letzte Waschpuffer eine hohe Konzentration einer Substanz enthält, die in der Lage ist, die dreidimensionale Konformation von Proteinen zu stabilisieren. In bekannten Verfahren ist diese Substanz z.B. Trehalose.
5. Das Substrat wird dann in üblicher Weise getrocknet, wobei die Trehalose aus dem Waschpuffer auf das Substrat präzipitiert wird.

Die Anwesenheit von z.B. Trehalose ist wichtig, um eine Denaturierung der Proteine während der Trocknung zu verhindern. Ziel ist, die an dem Substrat immobilisierten Proteine weitestgehend in ihrer natürlichen Konformation zu erhalten, dergestalt, daß z.B. immobilisierte Enzyme ihre katalytische Aktivität bzw. Antikörper ihre spezifischen immunologischen Eigenschaften beibehalten.

Ein Nachteil bei dem oben beschriebenen gattungsgemäßen Verfahren ist, daß die auf dem Substrat befindliche Trehalose die spätere Verwendung des Substrats

beeinträchtigen kann. Es ist daher in der Regel erforderlich, das getrocknete Substrat vor einer weiteren Anwendung bzw. Aufarbeitung sorgfältig zu waschen.

Aufgabe der Erfindung ist es, Verfahren und ein Substrat zu schaffen, mit denen sich dem oben beschriebenen Nachteil begegnen läßt.

Gelöst wird die Aufgabe mit Verfahren, die die kennzeichnenden Merkmale der Ansprüche 1 und 3 aufweisen sowie mit einem Substrat, das die kennzeichnenden Merkmale des Anspruches 4 aufweist.

Das erfindungsgemäße Verfahren gemäß Anspruch 1 sieht vor, daß neben den Proteinen auch die zur Stabilisierung der Proteine vorgesehene Substanz an die reaktiven Bindungsstellen des Substrats gekoppelt wird, wobei es sich bei dieser Substanz um ein bzw. mehrere unterschiedliche Polyole handeln kann. Polyole weisen OH-Gruppen auf und können damit wie Proteine an die reaktiven Bindungsstellen des Substrats binden.

Im Rahmen der Erfindung einsetzbare Polyole können z.B. Mono-, Di- oder Trisaccharide sein. Geeignet sind z.B. Maltose, Saccharose, Raffinose, Galaktose oder Glukose. Die obigen Aufzählungen sind nur beispielhaft und keinesfalls abschließend. Grundsätzlich sind alle Substanzen geeignet, die über OH-Gruppen an eine aktivierte Oberfläche eines Substrats gekoppelt werden können und die in der Lage sind, die dreidimensionale Konformation von Proteinen zu stabilisieren.

Besonders bevorzugt wird als Schutzsubstanz Trehalose eingesetzt. Die folgende Beschreibung der Erfindung nimmt im wesentlichen auf diese Substanz Bezug. Dies soll keine Einschränkung der Erfindung auf Trehalose darstellen. Es wird

ausdrücklich betont, daß andere Polyole in ähnlicher Weise wie für Trehalose beschrieben im Rahmen der Erfindung eingesetzt werden können.

Besonders bevorzugt werden Proteine und z.B. Trehalose gleichzeitig mit dem Substrat in Kontakt gebracht. Am einfachsten läßt sich dies erreichen, indem man die zur Immobilisierung eingesetzte Proteinlösung mit der Trehalose versetzt. In Abhängigkeit von der eingesetzten Trehalosekonzentration kommt es dann zu einer entsprechenden anteiligen Kopplung der Bindungsstellen mit der Trehalose und den Proteinen. Geeignete Trehalosekonzentrationen in der Proteinlösung liegen zwischen 1 und 100 g/l, besonders geeignet sind Trehalosekonzentrationen zwischen 5 und 50 g/l.

Anders als im Stand der Technik wird dabei die Trehalose bei dem erfindungsgemäßen Verfahren nicht auf die Substratoberfläche präzipitiert, sondern geht mit dieser Oberfläche genau wie die Proteine eine kovalente Bindung ein.

Die Immobilisierung der bevorzugt eingesetzten Trehalose auf dem Substrat hat keinen nachteiligen Einfluß auf ihre Funktion als Schutzsubstanz, die die Proteine während des Trocknens schützt. Wesentlicher Vorteil und Unterschied gegenüber dem Stand der Technik ist jedoch, daß die Trehalose aufgrund ihrer festen Kopplung an dem Substrat eine spätere Anwendung nicht mehr stört. Vor einer Aufarbeitung des getrockneten Substrates mit den daran immobilisierten Proteinen muß also kein aufwendiger Waschschrift mehr vorgesehen werden.

Wie oben erwähnt, werden Proteine bevorzugt in Gegenwart von Trehalose in Kontakt mit dem aktivierten Substrat gebracht, wobei es zu einer kompetitiven Kopplung der reaktiven Bindungsstellen zwischen den Proteinen und der Trehalose kommt. Der Anteil der gebundenen Trehalose läßt sich über ihre Konzentration z.B. in der zur Immobilisierung verwendeten Proteinlösung einstellen.

Das aktivierte Substrat kann z.B. ein Filter, Reaktionsgefäß, Chip, Mikrokanalsystem, Durchflußschlauchsystem, eine Membran, Pipettenspitze oder eine Durchflußkanüle sein.

Denkbar ist aber auch, Proteine und Trehalose getrennt, also z.B. die Trehalose vor oder nach der Proteinlösung, in Kontakt mit dem Substrat zu bringen. Dann allerdings wäre es deutlich schwieriger die Einstellung der Konzentration der gebundenen Trehalose auf dem Substrat zu steuern.

Ansonsten stimmt das erfindungsgemäße Verfahren im wesentlichen mit Verfahren aus dem Stand der Technik überein. Nach Immobilisierung der Proteine und der bevorzugt eingesetzten Trehalose auf dem Substrat kann gewaschen werden. Zum Waschen wird bevorzugt ein tensidhaltiger Puffer verwendet, der gegebenenfalls Trehalose enthalten kann.

In einem weiteren Schritt, der ebenfalls nicht zwingend ist, kann die Blockierung eventueller nicht besetzter reaktiver Bindungsstellen durch Zugabe eines Nukleophils erfolgen. Auch hier kann noch einmal Trehalose vorgesehen sein.

Es erfolgt dann ein letzter Waschschrift, bei dem im Stand der Technik die Trehalose zugegeben wird. Im Gegensatz dazu sollte beim erfindungsgemäßen Verfahren der in diesem Waschschrift verwendete Puffer keine Trehalose mehr enthalten, da nur so die unerwünschten Präzipitationen auf dem Substrat sicher vermieden werden können.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erreicht man also, daß auf dem Substrat keine nicht-gebundene Schutzsubstanz, z.B. Trehalose, mehr enthalten ist, die spätere Aufarbeitungen stören könnte. Die bevorzugt vorhandene gebundene

Trehalose ist, wie sich herausgestellt hat, ohne weiteres in der Lage, die auf dem Substrat immobilisierten Proteine zu stabilisieren.

Das erfindungsgemäße Verfahren gemäß Anspruch 1 betrifft im wesentlichen eine Abänderung eines an sich bekannten Aufarbeitungsprotokolls.

Denkbar ist aber auch, daß ein Substrat eingesetzt wird, auf dem bereits vorkonfektioniert die als Schutzsubstanz dienenden Polyole, und hier wiederum bevorzugt Trehalose, immobilisiert sind. Bei Verwendung eines solchen Substrates muß zumindest theoretisch während des gesamten weiteren Verfahrens zur Immobilisierung und Trocknung keine Schutzsubstanz, z.B. Trehalose, mehr zugegeben werden.

Die Erfindung soll auch Verfahren umfassen, die solche Substrate verwenden, sowie die Substrate selbst.

In einer besonders bevorzugten Ausgestaltung weist ein solches Substrat an seine Oberfläche gekoppelte Polymerketten auf. Erfindungsgemäß ist vorgesehen, daß die an dem Substrat angeordneten Polymerketten die erforderlichen Bindungsstellen zur Kopplung der Proteine ausbilden. Weiterhin sind an den Polymerketten die zur Stabilisierung der immobilisierten Proteine erforderlichen Polyole, z.B. Trehalose gebunden.

Die Polymerketten können unvernetzt mit jeweils ihrem einen Ende an die Oberfläche des Substrats gekoppelt sein und mit dem anderen Ende davon abstehen. Denkbar sind aber auch Vernetzungen der Polymere untereinander in unterschiedlichen Graden, bis hin zu einem Hydrogel.

Die erfindungsgemäß eingesetzten Substrate können generell nach z.B. der von Ulbricht et al. in Colloids and Surfaces Vol. 138, 1998, S. 353, beschriebenen in-situ-Technik mittels Photo-initiiertes-Pfropf-Polymerisation hergestellt werden.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Substrate werden bei der erwähnten Methode Monomere, an die Trehalose gebunden ist mit Monomeren, die die Bindungsstellen für die Proteine, z.B. esteraktive Gruppen, aufweisen copolymerisiert.

Durch Einstellung der Ausgangskonzentrationen der unterschiedlichen Monomere kann man ein gewünschtes Verhältnis zwischen Polyol- und Proteinbindungsstellen in den Polymeren auf besonders einfache Weise einstellen.

Denkbar ist natürlich, daß man noch weitere Monomere mit anderen Gruppen in die Polymere einpolymerisiert. Z.B. könnte man Monomere copolymerisieren, die PEG enthalten. Solche PEG-enthaltenen Polymere würden zusätzlich die Substratoberfläche gegen unspezifische Absorptionen anderer Proteinen abschirmen.

Bei der Herstellung der vorkonfektionierten Substrate können im Rahmen der Erfindung wiederum Polyole, z.B. Mono-, Di- oder Trisaccharide als Schutzsubstanzen eingesetzt werden. Geeignet sind z.B. Maltose, Saccharose, Raffinose oder Glukose. Grundsätzlich sind alle Substanzen geeignet, die über OH-Gruppen an eine aktivierte Oberfläche eines Substrats gekoppelt werden können und die in der Lage sind, die dreidimensionale Konformation von Proteinen zu stabilisieren.

Besonders bevorzugt wird als Schutzsubstanz Trehalose eingesetzt.



Im folgenden soll die Erfindung anhand von einem Beispiel näher erläutert werden. Das Beispiel betrifft ein im Rahmen der Erfindung durchführbares Protokoll, bei dem ein Protein und Trehalose gleichzeitig mit dem Substrat in Kontakt gebracht werden.

#### Beispiel: Immobilisierung von Trypsin an carboxylierte Nylonmembranen

Um mit aktivem Trypsin beschichtete Membranen zu erhalten, wie sie z.B. in der "Double Parallel Digestion"-Methode (Bienvenut et al. in Anal Chem Vol. 71, 1999, S. 4800–4807) zur Proteinidentifikation benutzt werden, und die darüber hinaus trockenbar sein sollen, wird wie folgt vorgegangen:

#### Verwendete Abkürzungen:

PP: Phosphatpuffer (0,1M, pH 4,8)

PVDF: Polyvinylidenfluorid

EDC: 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid

NHS: N-Hydroxysuccinimid

PBS: Phosphatgepufferte physiologische Salzlösung (pH 7,4)

Triton X: nichtionisches Detergens

Tween: nichtionisches Detergens

1. Eine carboxylierte PVDF-Membran (Millipore, Inc.) mit einer mittleren Porengröße von  $0,45\mu\text{m}$  wird 10 min mit PP inkubiert und sodann mit in PP gelöstem EDC (25mg/ml) sowie in PP gelöstem NHS (10mg/ml) im Verhältnis 1 : 1 für 12 min aktiviert.

2. Anschließend wird die aktivierte Membran mit PP gewaschen, und für 120 min mit einer PP-Lösung inkubiert, die Trypsin ( $2\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ ) sowie Trehalose (50g/l) enthält. Anschließend wird mit PP gewaschen.

3. Die Membran wird dann mit 20µg/100µl Methoxyethylamin für 10 min inkubiert, um Trypsin und Trehalose kovalent an die Membran zu binden.

4. Anschließend wird 3x mit PP, der 0,05% Triton X enthält, gewaschen, und mit PBS/Tween für 10 min inkubiert.

5. Die letzte Lösung wird dann entfernt und die Membran getrocknet.

Die nach dieser Methode mit aktivem Trypsin beladene Membran ist im trockenen Zustand lagerstabil und kann auf einfache Weise transportiert oder verschickt werden.

# Patentanwälte Schaefer & Emmel

European Patent Attorneys

Gehölzweg 20, D-22043 Hamburg

Dipl. - Phys. Konrad Schaefer

Dipl. - Biol. Dr. Thomas Emmel

Tel: (0)40-6562051 Fax: -6567919

Commerzbank 22 / 58226 Blz 200 40 000

Postbank 225058 - 208 Blz 200 10 020

05. Juni 2002

Eppendorf AG

---

Verfahren zur Immobilisierung von in einer flüssigen Probe enthaltenen Proteinen mit anschließender Trocknung der immobilisierten Proteine, sowie in dem Verfahren einsetzbare Festphasensubstrate.

---

## PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Immobilisierung von in einer flüssigen Probe enthaltenen Proteinen mit anschließender Trocknung der immobilisierten Proteine, bei dem zur Immobilisierung die flüssige Probe in Kontakt gebracht wird mit einem Substrat, das reaktive Bindungsstellen aufweist, die eine kovalente Bindung mit Aminogruppen eingehen und beim dem die anschließende Trocknung des Substrats in Gegenwart einer Substanz erfolgt, die in der Lage ist, die dreidimensionale Konformation von Proteinen zu stabilisieren, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Substanz Polyole eingesetzt werden und die Polyole während des Verfahrens an einen Teil der Bindungsstellen gebunden werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das eingesetzte Polyol ein Mono-, Di- oder Trisaccharid ist.
3. Verfahren nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß das eingesetzte Polyol Trehalose ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Polyol gleichzeitig mit den Proteinen in Kontakt mit den reaktiven Bindungsstellen gebracht wird.
5. Verfahren zur Immobilisierung von in einer flüssigen Probe enthaltenen Proteinen mit anschließender Trocknung der immobilisierten Proteine, bei dem zur Immobilisierung die flüssige Probe in Kontakt gebracht wird mit einem Substrat, das reaktive Bindungsstellen aufweist, die eine kovalente Bindung mit Aminogruppen eingehen und bei dem die anschließende Trocknung des Substrats in Gegenwart einer Substanz erfolgt, die in der Lage ist, die dreidimensionale Konformation von Proteinen zu stabilisieren, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein Substrat eingesetzt wird, das bereits vorkonfektioniert immobilisiertes Polyol als stabilisierende Substanz enthält.
6. Substrat zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Substrat mindestens einen flächigen Bereich aufweist, in dem Polymerketten an die Oberfläche des Substrats gekoppelt sind, die reaktive Bindungsstellen für das Protein aufweisen und an die das Polyol gebunden ist.
7. Substrat nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß zusätzlich in den Polymerketten PEG gebunden ist.

8. Substrat nach einem der Ansprüche 5 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß das immobilisierte Polyol Trehalose ist.
9. Substrat nach einem der Ansprüche 5 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß es ein Filter, Reaktionsgefäß, Chip, Mikrokanalsystem, Durchflußschlauchsystem, eine Membran, Pipettenspitze oder eine Durchflußkanüle ist.

# Patentanwälte Schaefer & Emmel

European Patent Attorneys

Dipl. - Phys. Konrad Schaefer

Dipl. - Biol. Dr. Thomas Emmel

Tel: (0)-40-6562051 Fax: -6567919

Gehölzweg 20, D-22043 Hamburg

Commerzbank 22 / 58226 Blz 200 40 000

Postbank 225058 - 208 Blz 200 10 020

05. Juni 2002

Eppendorf AG

---

Verfahren zur Immobilisierung von in einer flüssigen Probe enthaltenen Proteinen mit anschließender Trocknung der immobilisierten Proteine, sowie in dem Verfahren einsetzbare Festphasensubstrate.

---

## ZUSAMMENFASSUNG:

Verfahren zur Immobilisierung von in einer flüssigen Probe enthaltenen Proteinen mit anschließender Trocknung der immobilisierten Proteine, bei dem zur Immobilisierung die flüssige Probe in Kontakt gebracht wird mit einem Substrat, das reaktive Bindungsstellen aufweist, die eine kovalente Bindung mit Amino-  
gruppen eingehen und beim dem die anschließende Trocknung des Substrats in Gegenwart eines Substanz erfolgt, die in der Lage ist, die dreidimensionale Konformation von Proteinen zu stabilisieren, wobei als Substanz Polyole eingesetzt werden und die Polyole während des Verfahrens an einen Teil der Bindungsstellen gebunden werden.